

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790756

研究課題名(和文) シヌクレインの血管内皮における新規機能及びその臨床的意義の検討

研究課題名(英文) Analysis for novel function of alpha-synuclein in the endothelium and its clinical significance

研究代表者

鷹見 洋一 (Takami, Yoichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90621756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血中 シヌクレイン(SNCA)はメタボリック症候群(MetS)に対し保護的で、血圧やインスリン感受性に関与するが、加齢で低下した。SNCAは脂肪や骨格筋でLPAR2-Gab1-PI3K-Aktを介しGLUT-4による糖の取り込みを促進し、SNCA KOはPKC- γ やNFkB活性上昇によりインスリン抵抗性の悪化を呈した。血管内皮ではGab1-PI3K-Akt経路を介しeNOS活性化を促し、SNCA KOはeNOS機能低下により血圧上昇を示した。更にSNCAはNFkB活性抑制作用を有し、SNCA/ApoE KOは動脈硬化の悪化を呈した。以上よりSNCAの加齢に伴うMetSとの関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The physiological roles of α -synuclein (SNCA), one of the causative genes of Parkinson's disease, remain to be identified. SNCA was found to be secreted from endothelial cells (EC) and the human population study showed inverse correlation of serum SNCA levels with insulin resistance, high blood pressure and aging. Recombinant SNCA (rSNCA) promotes glucose uptake in the adipose tissues and skeletal muscles through the LPAR2/Gab1/PI3K/Akt pathway. rSNCA induces eNOS activation and NO production in EC via Gab1/PI3K/Akt pathway followed by cGMP production in co-cultured vascular smooth muscle cells. Aortas from SNCA KO show impairment of Ach-induced relaxation due to eNOS dysfunction. Treatment with rSNCA displays NF κ B inactivation in EC and in vivo study of SNCA/ApoE double-knockout mice shows exaggerated expression of inflammatory genes in aortas. These functions of SNCA represent a new insight of aging-related metabolic syndrome and the cardiovascular complications.

研究分野：老年医学

キーワード：シヌクレイン 血管内皮機能 老化 動脈硬化 インスリン抵抗性 炎症 NF κ B eNOS

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えたわが国において、疾患発症予防や治療を目的とした老化研究はますます重要性を増しており、中でも心血管疾患やそのリスクファクターについての新規バイオマーカーや治療標的分子の探求は、健康寿命の延長による医療費や福祉資源の有効活用に繋がる可能性が高い。我々はパーキンソン病の原因遺伝子の一つでもある脱ユビキチン化酵素 UCHL1 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1) が血管に内在することを見出し、血管リモデリングの制御分子でもあることを報告した。更に、その標的蛋白の一つであるαシヌクレイン (SNCA) が血管内皮に発現していることを発見した。SNCA はパーキンソン病の原因物質で、その病理組織学的特徴であるレビー小体の主要構成成分であり、大脳基底核におけるドーパミン産生細胞へ毒性によりその発症に関わっていることは周知のことであるが、SNCA の生理的機能、特に神経以外での機能については全く分かっていない。

我々は SNCA が血管内皮細胞から分泌され、血中に液性因子として存在していることを見出した (図 1)。

SNCAは血管内皮細胞に発現し、分泌される。



図 1

また、ヒト臨床検体を用いた横断研究により、血中 SNCA はメタボリックシンドロームに対し保護的に作用するが、加齢とともに低下するという新規の現象を発見し、更に血圧やインスリン抵抗性と相関を示すことを見出した。(表 1)

更に、マウスでも加齢に伴い血中 SNCA は低下し (図 2)、SNCA ノックアウトマウス (SNCA KO) はメタボリック症候群の表現型 (血圧上昇、脂質異常、内臓肥満) を呈した。

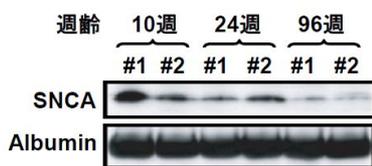


図 2

TABLE 1: Univariate Linear Regression Model				
Parameter Estimates				
Variable	Estimate (β)	StdErr	tValue	P-value
Age	-0.27775	0.07460	-3.72	0.0002
BMI	-0.95687	0.27199	-3.52	0.0005
HOMA IR	-4.85829	0.88828	-5.47	<.0001
IRI	-1.46830	0.25754	-5.70	<.0001
Glucose	-0.09380	0.04657	-2.01	0.0442
SBP	-0.17848	0.04333	-4.12	<.0001
DBP	-0.30613	0.08728	-3.51	0.0005
RBC	0.07289	0.02294	3.18	0.0015
Hb	1.91436	0.72883	2.63	0.0087
Hct	0.95129	0.26084	3.65	0.0003

Dependent Variable: SNCA concentration (ng/dL)

端野・壮警町研究、N=1152

2. 研究の目的

本研究では、前述の結果に基づき、糖代謝及び血管内皮機能やその恒常性の破綻により惹起される動脈硬化との関連に焦点を当て、加齢性疾患として最も重要な予後規定因子である心血管合併症進展への関与における老化関連分子としての SNCA の病態生理機能の解明を目的とする。更には 2 つの確かな臨床情報を有する疫学研究の臨床検体を用いて、一般集団及び高齢者における SNCA の新規バイオマーカーとしての有用性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

方法については研究結果とともに記載。

4. 研究成果

(1)血管内皮機能

前述の如く、SNCA は EC に発現し、また、SNCA KO は血圧の上昇を認めるため、SNCA の血管内皮機能への関与を、大動脈へのアセチルコリン負荷により評価したところ、SNCA KO の大動脈は、弛緩反応が减弱しており、eNOS 機能変化による血管内皮機能障害が示唆された (図 3)。

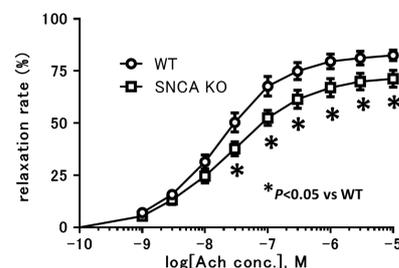


図 3

図4に示すように rSNCA は eNOS 活性を上げる生理活性を持ち、後述の脂肪細胞と同様に Gab1 が活性化され、Akt のリン酸化を経て、eNOS が活性化する作用が認められた。

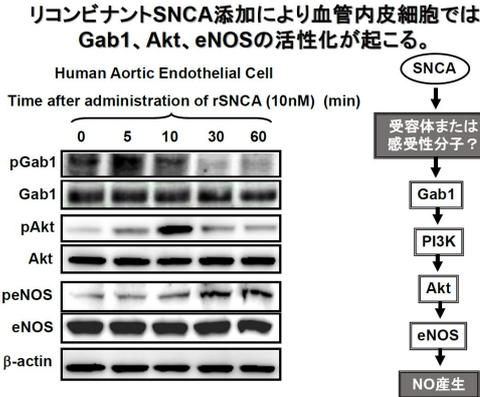


図4

また、Human Aortic Endothelial Cell (HAEC) と Human Aortic Smooth Muscle Cell (HASMC) をリコンビナント SNCA (rSNCA) の存在下に共培養し、培養液中の NO 及び cGMP を定量すると、図5に示す様に HAEC からの NO の産生及びそれに伴う HASMC からの cGMP の産生の増加が確認できた。

rSNCAの添加により血管内皮細胞からのNOの産生及びそれによる平滑筋細胞でのcGMPの産生が増加する。

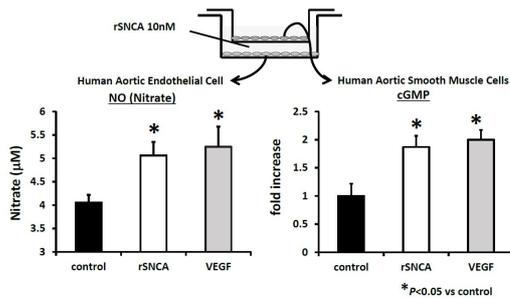
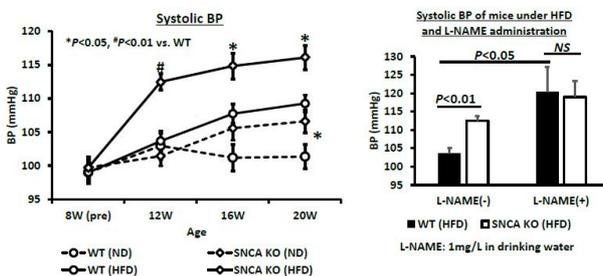


図5

SNCA KOは高脂肪食負荷にてWTに比し、血圧の上昇を認めるが、L-NAME投与でその差を認めなくなった。



N=7-10

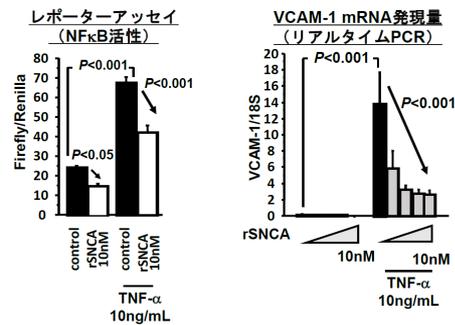
図6

血管内皮機能を最も反映する血圧を検討すると、図6に示す様に特に高脂肪食負荷下

の SNCA KO において血圧の上昇を認め、また、その差は L-NAME 投与下で消失した。このことより、SNCA KO における血圧の上昇は eNOS の機能低下によるものと考えられ、前述の in vitro における結果を支持するものである。

更に、血管内皮機能や動脈硬化の中心的な役割を担う転写因子 NFκB 活性への作用を検討したところ、EC において、SNCA の過剰発現、rSNCA の添加共に NFκB 活性を抑制し、その下流の遺伝子発現も抑制した(図7)。

SNCAはNF-κB活性を抑制し、その下流遺伝子の発現も抑制する。



ヒト大動脈血管内皮細胞 (リコンビナントSNCA添加)

図7

従って、SNCA は動脈硬化の病態において中心的な役割を担う NFκB 活性を抑制していると考えられるため、loss-of-function によりその進展が促進されると考えられる。これを検討するため、SNCA と ApoE のダブルノックアウトマウス(DKO)を作製し、高脂肪食負荷を行ったところ、DKO の大動脈では NFκB で発現調節される炎症性分子の発現の上昇を認め、動脈硬化形成の増悪を示唆する遺伝子発現の結果が得られた(図8)。

SNCAとApoEのダブルKO (DKO) ではコントロール (ApoE KO) に比し、大動脈における接着分子及び炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加していた。(高脂肪食負荷1.5ヶ月)

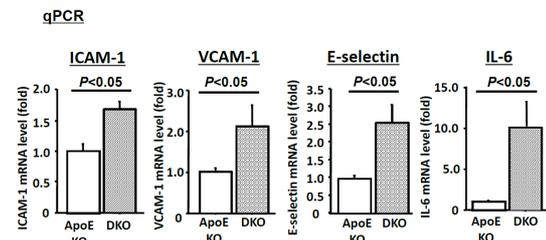


図8

(2) 糖代謝機能

in vitro にてインスリンシグナルの検討を行ったところ、脂肪細胞や骨格筋細胞への rSNCA 添加により、インスリンレセプターを介する

シグナルとは独立して、アダプター蛋白である Gab1 のリン酸化が起こり、その下流の PI3 kinase-Akt 経路を経て、GLUT-4 によるグルコースの取り込みが促進されることが分かった(図 9, 10)。

SNCAはGLUT4による糖の取り込みを促進する。

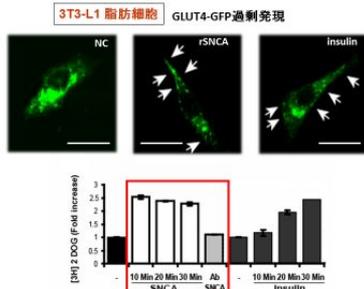


図 9

リコンビナントSNCA添加により脂肪細胞では Gab1、Aktの活性化が起こる。

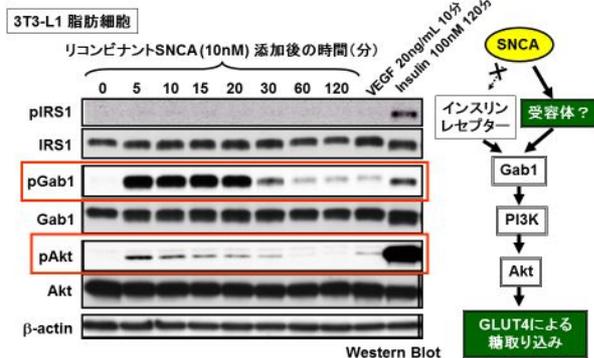


図 10

また、その作用は in vivo においても確認できた(図 11)。

SNCAは組織での糖の取り込みも促進する。

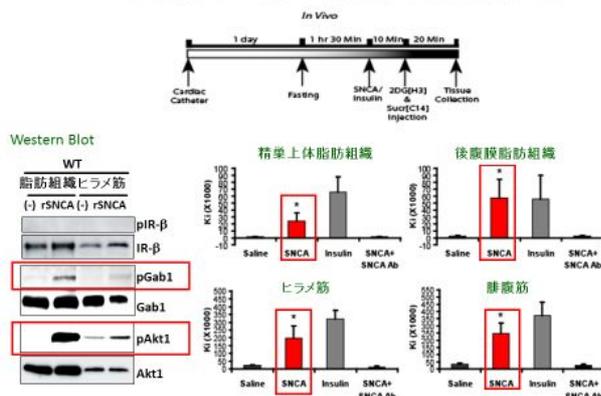


図 11

これらの結果は Gab1 の上流にある SNCA の感受性分子または受容体の存在を示唆するものであり、SNCA と Gab1 は G 蛋白共役受容体(GPCR)との関連を示唆する報告があるため、

ヒト GPCR 379 個の siRNA ライブラリーを用いて HEK293 細胞でスクリーニングを行った。各 GPCR をノックダウンし、rSNCA を添加した際の Akt のリン酸化を ELISA にて評価し、その程度が最も小さいものを候補分子として選定した。最終的に SNCA をリガンドとし、以下の Gab1-PI3K-Akt-GLUT4 による糖の取り込みに関与する受容体として LPAR2 (lysophosphatidic acid receptor 2) を同定した。3T3-L1 脂肪細胞でも図 12 に示す様に LPAR2 のノックダウンにより Akt 及び Gab1 のリン酸化をともに抑制し、グルコースの取り込みも抑制した。

脂肪細胞におけるSNCAのレセプターとしてLPAR2を同定した。

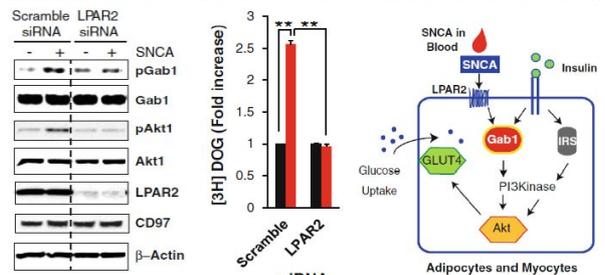


図 12

高脂肪食に多く含まれる飽和脂肪酸はインスリンシグナル伝達障害を惹起することでインスリン抵抗性の病態に深く関与するが、2つの重要なメカニズムが存在する。一つが PKC-θのリン酸化でもう一つは TLR4 から始まるシグナル伝達の活性化である。前者は Ser1101 のリン酸化により IRS-1 の不活化を起こし、後者は NFκB 活性化に伴う炎症によりインスリンシグナルの障害をもたらす。図 13 に示すように、rSNCA が脂肪細胞において飽和脂肪酸であるパルミチン酸による PKC-θや NFκB の活性化を抑制することを確認した。

リコンビナントSNCAは脂肪細胞(3T3-L1脂肪細胞)においてパルミチン酸による PKC-θのリン酸化及びIRS-1(Ser307)のリン酸化を抑制する。

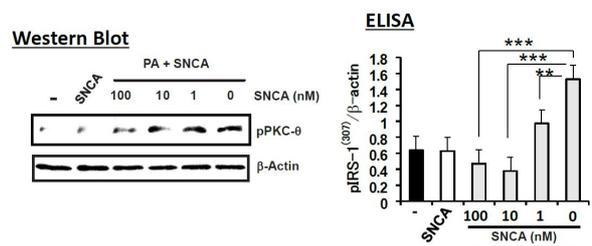


図 13

これらの結果に基づき、SNCA KO における糖代謝機能を検討したところ、SNCA KO は高

脂肪食負荷により耐糖能異常及びインスリン抵抗性を認めた(図 14)。

高脂肪食下のSNCA KOは耐糖能障害、インスリン抵抗性の悪化を認める。

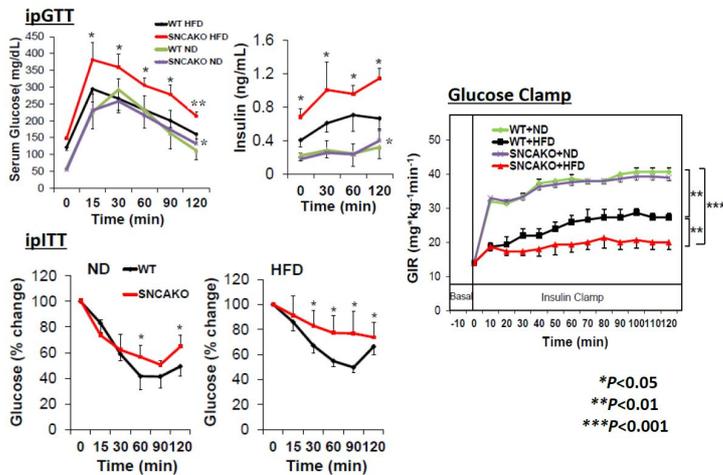


図 14

(3)臨床研究

端野・壮瞥町研究

一般集団 1152 人について、背景に記した臨床パラメーターについて更に詳細に横断的に多変量解析を行うと、表 2 及び表 3 に示す様に、年齢、HOMA IR、血圧、Ht が SNCA の血中濃度に対する独立規定因子であることが分かり、これまで基礎的な検討で示した血管内皮機能や糖代謝機能に対する SNCA の関与が臨床的検討でも明らかとなった。

Table2: Initial Multivariate Linear Regression Model						
Parameter Estimates						
Variable	Estimate (β)	StdErr	tValue	P-value	Tolerance	Variance Inflation
Intercept	34.36649	13.91504	2.47	0.0137	--	--
Age	-0.16930	0.08993	-1.88	0.0600	0.66018	1.51474
BMI	-0.45627	0.30940	-1.47	0.1406	0.74261	1.34660
HOMA IR	-4.95366	1.10339	-4.49	<.0001	0.62547	1.59879
Glucose	0.03628	0.05330	0.68	0.4962	0.72269	1.38373
SBP	-0.01575	0.06671	-0.24	0.8134	0.40408	2.47477
DBP	-0.29285	0.12082	-2.42	0.0155	0.49728	2.01095
RBC	-0.00632	0.04613	-0.14	0.8911	0.24482	4.08458
Hct	1.58563	0.51345	3.09	0.0021	0.25241	3.96181

Dependent Variable: SNCA concentration (ng/dL)

Table 3: Final Multivariate Linear Regression Model						
Parameter Estimates						
Variable	Estimate (β)	StdErr	tValue	P-value	Tolerance	Variance Inflation
Intercept	36.22095	13.13491	2.76	0.0059	--	--
Age	-0.16978	0.07445	-2.28	0.0228	0.96098	1.04061
BMI	-0.47702	0.30565	-1.56	0.1189	0.75931	1.31698
HOMA IR	-4.60500	0.97431	-4.73	<.0001	0.80043	1.24932
DBP	-0.31489	0.09063	-3.47	0.0005	0.88188	1.13394
Hct	1.54805	0.27585	5.61	<.0001	0.87261	1.14598

Dependent Variable: SNCA concentration (ng/dL)

SONIC 研究

本研究は平成 22 年より当科にて始動した高齢者に特化したコホート研究である。70 歳の血中 SNCA 濃度を測定すると、都市部である伊丹市に比し、農村部である朝来市で有意な上昇を認めた(図 15)。

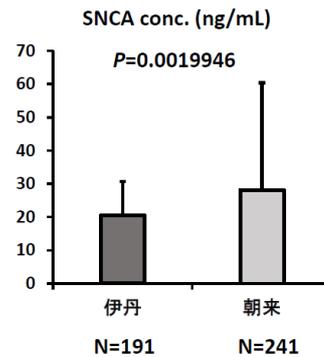


図 15

本研究では一般住民台帳より無作為に抽出した 70 歳、80 歳、90 歳、更に 100 歳以上を対象として各々 500 名(100 歳以上は 200 名)を 3 年ごとに調査しており、現在も続行している。将来的には加齢に伴う生活習慣病を機軸とした解析を行い、健康長寿への影響を解明することを目的としている。本研究結果に関連しては、今後メタボリックパラメーターを中心に血中 SNCA 濃度との関連を検討し、頸動脈エコーを指標とした動脈硬化及び心血管合併症、糖代謝異常への関与が健康長寿へ寄与する可能性を検討し、農村部で血中 SNCA 濃度が高くなる意義についても言及する。

SNCA に関する研究は、これまで神経変性疾患での解析がほとんどで、老化や心血管疾患を含む生活習慣病についての基礎及び臨床研究はこれまで皆無である。本研究は、SNCA が加齢、メタボリック症候群、心血管疾患の病態生理全てに関与する機能性分子である可能性を示し、かつ一般集団の疫学研究によりヒトに対してもバイオマーカーや治療標的分子としての可能性を示す非常に独創性の高いものである。更に本研究では、一般集団のみならず、高齢者に特化した疫学研究により超高齢社会での有用性を前述のコホート研究で検討し、基礎的検討に加え、臨床面からのアプローチにてもその意義を確立しようとするものである。また、パーキンソン病やレビー小体型認知症等の認知症と生活習慣病、動脈硬化の hokokusy 発症、

進展に対して同一分子を基盤として解析できる利点もあり、将来的には、これら疾患との関連も検討したいと考えている。

現状での本研究の進捗から考察すると、末梢組織ではSNCAはeNOS活性化作用やNFκB抑制作用により血管内皮機能を維持し、本研究にて示す糖代謝機能の改善作用も相乗して、抗動脈硬化作用があると考えられる。つまり、図16の如く、加齢に伴うSNCAの低下はメタリック症候群における複雑な病態のネットワーク形成に關与し、脂肪組織等のインスリン標的臓器への影響は、最も重要な予後規定因子である心血管合併症へと繋げる重要な要素の一つであるという新規の液性因子としてのSNCAの病態生理機能を提唱するものである。

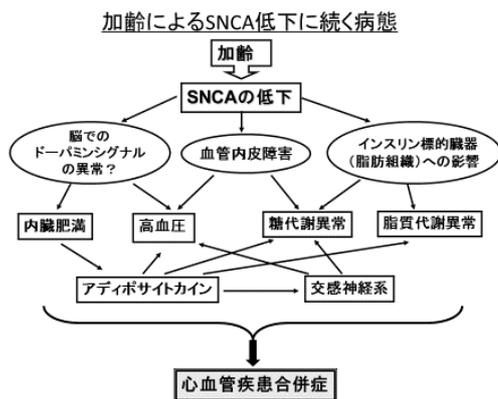


図 16

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

1, Rodriguez-AraujoG, Nakagami H, Takami Y, Katsuya T, Akasaka H, Saitoh S, Shimamoto K, Morishita R, Rakugi H, Kaneda Y.

Low alpha-synuclein levels in the blood are associated with insulin resistance.

Sci Rep. 2015 in press.

2, Rodriguez-AraujoG, Nakagami H, Hayashi H, Mori M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Nakaoka Y, Takami Y, Komuro I, Morishita R, Kaneda Y.

Alpha-synuclein elicits glucose uptake and utilization in adipocytes through the Gab1/PI3K/Akt transduction pathway.

Cell Mol Life Sci. 70(6):1123-33.2013.

〔学会発表〕(計8件)

主要なもの：

第21回 日本血管生物医学会学術集会 (YIA最優秀賞) 2013年9月28日 大阪

CAMDセミナー(招待講演) 2013年7月25日 国立長寿医療研究センター

第55回 日本老年医学会学術集会(合同選抜ポスター優秀賞) 2013年6月4日 大阪

日本高血圧学会 第1回 臨床高血圧フォーラム(優秀ポスター賞) 2012年5月12日 大阪

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/geriat/www/jgrpb.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鷹見 洋一 (TAKAMI, Youichi)

大阪大学大学院医学系研究科

老年・腎臓内科学

研究者番号：90621756

(2) 研究分担者

中神 啓徳 (NAKAGAMI, Hironori)

大阪大学大学院医学系研究科

健康発達医学

研究者番号：20325369

(3) 連携研究者

金田 安史 (KANEDA, Yasufumi)

大阪大学大学院医学系研究科

遺伝子治療学

研究者番号：10177537